

Panu Jaakkola, Johanna Myllyharju, Peppi Karppinen ja Kari Alitalo

Nobelin palkinto 2019 solujen hapen-tunnistusmekanismien löytäjille

Vuoden 2019 fysiologian ja lääketieteen Nobelin palkinnon saivat Sir Peter Ratcliffe (Oxfordin yliopisto, Yhdistynyt kuningaskunta), William Kaelin Jr. (Harvard Medical School, Boston, Yhdysvallat) ja Gregg Semenza (Johns Hopkins University, Baltimore, Yhdysvallat) (**KUVA 1**) solujen molekyyli-tason hapentunnistusmekanismien löytämisestä. Sama kolmikko sai vuonna 2016 yhdysvaltalaisen lääketieteellisen Lasker Award -palkinnon, joka on monesti ennustanut Nobelin palkinnon saamista (1).

Riittävä hapensaanti on välttämätöntä ihmisten lisäksi kaikille korkeammille elämänmuodoille energian tuottamiseksi mitokondrioissa. Solujen on pystyttävä reagoimaan hapenpuut-

teeseen eli hypoksiaan nopeasti sekä pitämään hapensaanti riittävänä. Hapen merkitys elimistölle ja punasolujen rooli hapenkuljetuksessa on tunnettu pitkään.

Ensimmäiset mekanismit, joilla solut reagoivat hypoksiaan, löydettiin vasta 1990-luvulla huolimatta siitä, että hypoksian tiedetään olevan merkittävä tekijä lukuisissa sairauksissa. Näihin kuuluvat muun muassa munuaisten vajaatoiminnasta ja muista syistä johtuvat anemiat, sydän- ja verisuonitautien ja diabeteksen komplikaatiot sekä monet tulehdustilat. Hypoksialla on merkittävä rooli myös syövän kasvussa ja resistenssissä säde- ja lääkehoidolle (2). Nykyään tiedetään, että solut reagoivat hypoksiaan aktivoimalla satojen geenien luen-



KUVA 1. Vuoden 2019 Lääketieteen Nobel-palkinnon saajat. Vasemmalta Gregg Semenza, William Kaelin Jr. ja Sir Peter Ratcliffe. Kuva Institute De Francen palkinnonjakoseremoniasta vuodelta 2012.

taa. Tätä kautta hypoksia lisää punasolujen määrää ja hapenkuljetusta kudoksiin, muuttaa energia-aineenvaihdunnan mitokondriaalisesta glykolyyttiseksi sekä auttaa soluja selviytymään vähähappisissa olosuhteissa.

Hapentunnistusmekanismien jäljille päästiin munuaisista erittyvän, punasolujen tuotantoa lisäävän erytropoietiini (EPO) -geenin kautta. Semenzan ryhmä löysi EPO-geenistä hypoksiassa aktivoituvan DNA-sekvenssin (hypoxia response element, HRE) (3). Ratcliffen ryhmä huomasi nopeasti, että HRE-mekanismi ei ole spesifinen EPO:lle tai munuaissoluille, vaan se toimii käytännössä kaikissa ihmisen soluissa (4). Vastaavia HRE-alueita tunnistettiin myöhemmin useista muistakin hypoksiassa indusoituvista geeneistä, mukaan lukien useat glykolyttiset entsyymit (5,6).

Seuraava läpimurto tapahtui, kun Semenzan ryhmä eristi hypoksiaindusoituvan tumatekijän (7). Se koostui kahdesta proteiinista, jotka nimettiin hypoksiassa indusoituviksi tekijöiksi (hypoxia inducible factor, HIF) 1 alfa ja 1 beeta (HIF-1 α ja HIF-1 β). Ryhmä osoitti, että HIF-1-alfa-proteiinin hajotustahti on happiosapaineesta riippuvainen.

Ryhmä osoitti myös, että HIF lisää useiden muidenkin hypoksiassa indusoituvien geenien luentaa. Tällaiset geenit tuottavat esimerkiksi endoteelikasvutekijää (VEGF), joka on oleellinen verisuonten uudiskasvussa esimerkiksi ateroskleroottisten kudosiskemioiden ja syöpäkasvainten yhteydessä. Solujen HIF-1-alfapitoisuus lisääntyykin voimakkaasti erityisesti syöpäkasvainten huonosti happeutuneissa osissa. Pian HIF-1-alfan löydyttyä Ratcliffen ryhmä tunnisti siitä uudentyyppisen alueen, joka vastaa HIF-1-alfan hapestä riippuvaisesta hajotuksesta (8).

Samanaikaisesti Semenzan ja Ratcliffen hypoksiatutkimusten kanssa Kaelin tutki perinnöllistä von Hippel-Lindaun (VHL) tautia. Sitä sairastavilla on riski sairastua muun muassa hemangioomiin, feokromosytoomaan sekä kirkassoluiseseen munuaissyöpään, joissa kaikissa on huomattavan runsas uudisverisuonitus. Kaelinin ryhmä eristi VHL-geenin ja osoitti sen tuottaman proteiinin (pVHL) estävän kasvainten kasvua (9). Suurimmasta osasta

kirkassoluisia munuaissyöpiä löytyi joko VHL-geenin mutaatio tai inaktivaatio, minkä Kaelin osoitti johtavan hypoksiavasteesta tuttuun geenien ilmentymiseen. Tämä löydös liitti yhteen kaksi alun perin erillisiltä näyttävää tutkimuskohdetta, hypoksiavasteen ja VHL-geenin mutaatiot (10).

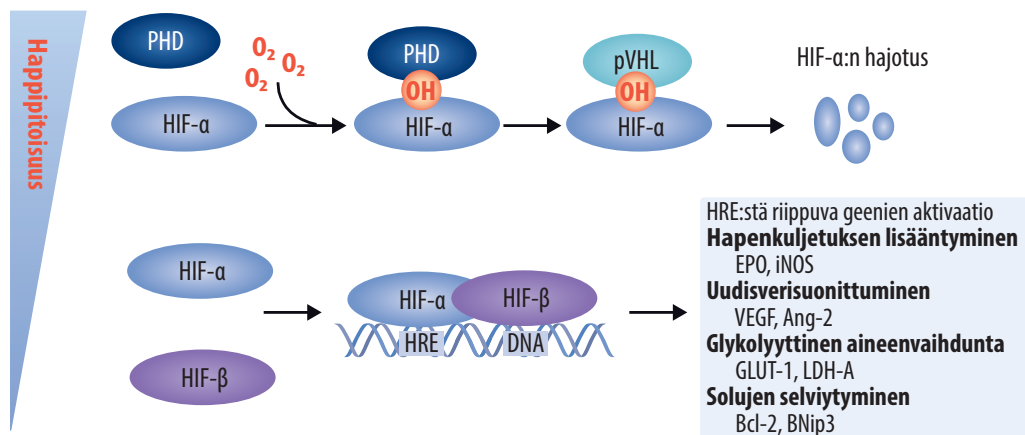
Kaelin osoitti myös, että VHL on osa E3-ubikitiiniligaasi-proteiinikompleksia, joka säätelee monien valkuaisaineiden proteasomaalista hajotusta (11). Pian tämän löydöksen jälkeen Ratcliffen ryhmä näytti, että pVHL:ää vaaditaan HIF-1-alfan hajotukseen, jota ei tapahdu hypoksiassa, jossa HIF-1-alfa ja siitä riippuvainen hypoksinen geeniluunta aktivoituvat (12).

Viimeisenä palapelin osana oli ymmärtää mekanismi, jolla HIF-1-alfa merkitään hapestä riippuvaisesti siten, että pVHL tunnistaa sen hajotuksen kohteeksi fysiologisessa happiosapaineessa. Merkitsemisen tiedettiin vaativan hapen lisäksi rauta-atomeja, mikä johti useisiin teorioihin mekanismista sekä kilpajuoksuun niiden löytämiseksi. Tutkijat ehdottivat, että hemin kaltainen proteiini voisi toimia hapen tunnistajana, että happiradikaalit muokkaisivat HIF-1-alfaa tai että HIF itse sitoisi rautaa hemin tavoin.

Yllättävä lopputulos, jota tekemässä oli myös Panu Jaakkola, julkaistiin vuonna 2001 Ratcliffen ja Kaelinin ryhmien rinnakkaisina artikkeleina Science-lehdessä (13,14). Artikkeleissa osoitettiin, että HIF-1-alfa merkitään hydroksyloimalla proliini-aminohappo reaktiossa, joka vaatii happea. Tämä johtaa pVHL-kompleksin sitoutumiseen ja HIF-1-alfan hajottamiseen, kun tarjolla on riittävästi happea. Aiemmin oli luultu, että prolyylihydroksylaatiota tarvitaan vain kollageenien synteessissä.

Pian tämän jälkeen löydettiin merkitsemiseen tarvittavat entsyymit (15,16). Nämä HIF-prolyylihydroksylaasit, joita tunnetaan kolme isoentsyymiä (PHD1–3, EGLN2,1,3 ja HIF-P4H-1–3), toimivat happisensoreina kaikissa eläinsoluissa ja reagoivat hyvin nopeasti tilanteissa, joissa hapen osapaine laskee liikaa (KUVA 2).

Tämänvuotiset Nobelin palkinnon saajat tekivät havaintoja, joilla on perustavanlaatuinen merkitys sekä ihmisen fysiologian että monien



KUVA 2. Solujen geenitoiminnan aktivoituminen ja suojausmekanismi happipitoisuuden pienentyessä. Riittävässä happiosapaineessa HIF-prolyylihydroksylaasi (PHD) merkitsevät HIF-alfa-proteiinin hydroksylaatiolla (OH), mikä johtaa VHL-geenin tuottaman proteiinin (pVHL) sitoutumiseen sekä HIF-alfan hajottamiseen proteasomeissa. Hypoksiassa HIF-alfa stabiloituu ja sitoutuu HIF-beetan kanssa hypoxia response element (HRE) -geenisäätelyalueisiin. Tämä johtaa yli 300 geenin aktivoitumiseen. Niillä on tehtäviä hapen kuljetuksen ja verisuonituksen lisäämisessä sekä glykolyttisen aineenvaihdunnan ja solujen suojelun aktivoimisessa. Esimerkkejä aktivoituvista geeneistä on merkitty kuvaan.

Ang-2 = angiopoietin 2, Bcl-2 = B-cell lymphoma 2, BNip3 = BCL2 interacting protein 3, EPO = erythropoietin, GLUT-1 = glucose transporter 1, HIF = hypoxia inducible factor, iNOS = inducible nitric oxide synthase, LDH-A = lactate dehydrogenase A

sairauksien syntymekanismien ymmärtämises-
 sä. Nähtäväksi jää, millaisia lääkkeitä heidän
 keksimiinsä hapen tunnistumekanismeihin
 voidaan kohdistaa erilaisten sairauksien yhtey-
 dessä. Rohkaisevaa on, että ensimmäinen lääke,
 joka estää PHD2:n toimintaa, on hyväksytty
 munuaisten vajaatoiminnasta johtuvan ane-
 mian hoitoon Aasiassa. Myös munuaissyövässä
 aktivoituvan HIF-2-alfan pienimolekyylinen
 estäjä on antanut lupaavia tuloksia edennyt-
 tä munuaissyöpää sairastavien potilaiden hoidos-
 sa varhaisen vaiheen kliinisissä kokeissa.

Jaakkola työskenteli tutkijatohtorina Ratclif-
 fen ryhmässä vuosina 1999–2001 ja oli avain-
 tekijä tuona aikana syntyneessä Nobelin pal-

kintoon johtaneessa työssä. Hän on jatkanut
 tutkimusyhteistyötä ryhmän kanssa. Peppi
 Karppinen oli tutkijatohtorina Kaelinin ryh-
 mässä vuosina 2007–2008 ja jatkaa tutkimus-
 yhteistyötä ryhmän kanssa. Johanna Myllyhar-
 ju tekee tutkimusyhteistyötä Ratcliffen kanssa,
 ja Ratcliffe on toiminut tieteellisen asiantuntija-
 ryhmän jäsenenä solujen ja soluväliaineen vuo-
 rovaikutuksen huippuyksikössä (2012–2017),
 jonka varajohtaja Myllyharju oli. Kari Alitalo
 työskentelee aihepiiriin läheisesti liittyvällä tut-
 kimusalueella, ja hän on tuntenut nobelistit pit-
 kään useista kansainvälisistä yhteyksistä, muun
 muassa Yhdysvaltain National Academyn jäse-
 nenä. ■

PANU JAAKKOLA, LT, professori, vs. tutkimusjohtaja
 HUS Syöpäkeskus ja Helsingin yliopisto

JOHANNA MYLLYHARJU, FT, professori
 PEPPI KARPPINEN, LT, professori
 Oulun yliopisto

KARI ALITALO, LT, akatemiaprofessori
 Helsingin yliopisto

KIRJALLISUUTTA

1. Karppinen P. Lasker Award -palkinto hypoksiavastereitin selvittäjille – reitin lääkkeet edenneet kliinisissä kokeissa viimeisen vaiheeseen. *Duodecim* 2017;133:9.
2. Minn H, Jaakkola P. Kasvainhypoksia: haitta vai mahdollisuus? *Duodecim* 2005;121:1601–4.
3. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5680–4.
4. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2423–7.
5. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, ym. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994;269:23757–63.
6. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6496–500.
7. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230–7.
8. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, ym. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997;272:11205–14.
9. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1995;1:822–6.
10. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, ym. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10595–9.
11. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, ym. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998;18:732–41.
12. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, ym. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271–5.
13. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, ym. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468–72.
14. Ivan M, Kondo K, Yang H, ym. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 2001;292:464–8.
15. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, ym. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43–54.
16. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337–40.